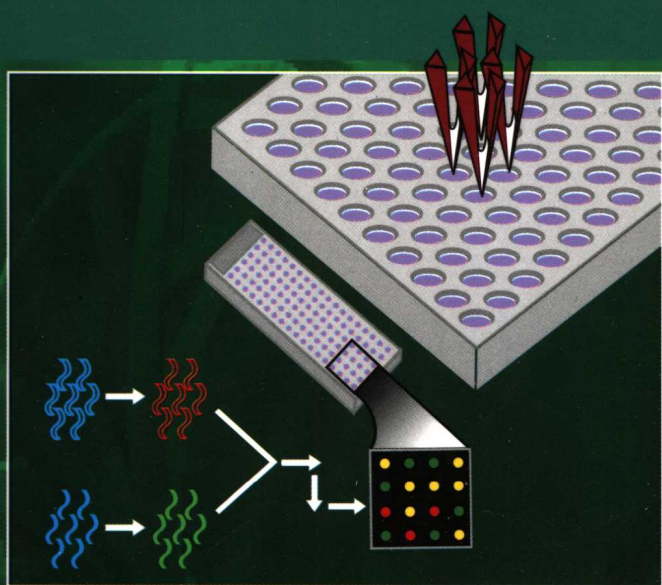


高等学校教材

基因工程技术 实验指导

钟卫鸿 主编



化学工业出版社

高等学校教材

基因工程技术实验指导

钟卫鸿 主编



化学工业出版社

·北京·

本书内容涵盖基因克隆、重组、表达、提取、纯化以及检测的常用基因工程技术操作实验,分“基因工程基本技术”和“应用基因工程技术”两个大类型共33个实验,既注重培养学生的基本操作技能,又利于启发学生分析和解决问题的能力。书中的实验可自行拆分,便于师生根据课时及学习需求灵活选择。书后附有实验操作常用的试剂配方及相关操作注意事项等参阅资料。

本书可供高等院校生物工程、生物技术及相关专业的师生参考,也可作为科研及技术人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

基因工程技术实验指导/钟卫鸿主编. —北京:化学工业出版社, 2007. 7

高等学校教材

ISBN 978-7-122-00401-7

I. 基… II. 钟… III. 基因-遗传工程-实验-高等学校-教材 IV. Q78-33

中国版本图书馆CIP数据核字(2007)第062187号

责任编辑:梁静丽 郎红旗

装帧设计:张辉

责任校对:王素芹

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 装:化学工业出版社印刷厂

787mm×1092mm 1/16 印张8½ 字数190千字 2007年6月北京第1版第1次印刷

购书咨询:010-64518888(传真:010 64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价: 15.00 元

版权所有 违者必究

编写人员名单

钟卫鸿 汪 琨 邱乐泉
钱海丰 朱廷恒

前 言

由于分子生物学和基因工程技术的快速发展,尤其是 2001 年人类基因组计划的完成及与其他学科领域的交叉渗透,对基因工程技术的理论和实践在各个层面上均产生了巨大的推进和影响作用。众多国内高校的生物技术或生物工程类专业纷纷开设了基因工程及相关方向的课程,包括理论和实验课程。笔者从 2000 年开始在浙江工业大学生物工程专业开始讲授基因工程课程,在教学中强调将基因工程技术理论与实验指导结合的教学模式,这有利于基因工程技术教学取得良好的效果。该课程于 2005 年被列为浙江省精品课程。但国内配套这种教学模式的教材尚未见出版。因而,我们在自编讲义《基因工程技术》和《基因工程实验指导》的基础上,尝试编写并出版《基因工程技术》和《基因工程技术实验指导》配套姊妹教材,既是浙江省精品课程建设的需要,也是该类教材出版的一种新尝试。

《基因工程技术实验指导》一书强调基本技术和应用技术的结合,既注重培养学生的基本操作技能,又注重基本技术的拓展应用,有利于启发学生分析和解决问题的能力。全书分两个部分,11 个实验单元共 33 个实验。第一部分“基因工程基本技术”共设置了基因组的提取与检测、核外 DNA 提取、核酸电泳与回收、从低熔点胶琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段、感受态细胞的制备、重组质粒的连接、转化和筛选、DNA 扩增技术、cDNA 文库的构建、Southern 杂交、Northern 杂交和菌落原位杂交、蛋白质印迹分析等实验单元;第二部分“应用基因工程技术”共设置了环境基因组 DNA 的提取、荧光定量 PCR、DGGE、分子杂交、16S RNA 及 Blast 和系统树软件应用、荧光基因标记等分子生态学和分子鉴定实验单元,以及综合性实验单元:赤霉素基因工程菌的构建及其发酵和产物分离。本书各实验单元可按照各校的实际自行拆分组合,便于师生根据课时及学习需求灵活选择。

全书由钟卫鸿教授主编,第一至七章及附录由汪琨、钟卫鸿编写;第八章由钱海丰编写;第九章由邱乐泉编写;第十章由钟卫鸿编写;第十一章由朱廷恒编写。感谢浙江工业大学以及编写和出版过程中化学工业出版社的支持和帮助。

限于时间和作者水平,本书仍然有疏漏和不当之处,恳请广大读者和专家批评指正。

钟卫鸿

2007 年 3 月 28 日

目 录

第一部分 基因工程基本技术	1
第一章 基因组的提取与检测	1
实验 1.1 植物基因组 DNA 的提取	3
实验 1.2 动物基因组 DNA 的提取	6
实验 1.3 细菌基因组 DNA 的制备	8
实验 1.4 病毒基因组 DNA 的提取	9
实验 1.5 基因组 DNA 的检测	11
第二章 核外 DNA 提取	13
实验 2.1 质粒 DNA 提取	13
实验 2.2 线粒体 DNA 的提取	17
实验 2.3 叶绿体 DNA 的提取	19
第三章 核酸电泳与回收	23
实验 3.1 DNA 琼脂糖凝胶电泳	26
实验 3.2 RNA 琼脂糖凝胶电泳	28
实验 3.3 从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA 片段	29
实验 3.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳	31
第四章 重组质粒的连接、转化和筛选	35
实验 4.1 感受态细胞的制备	35
实验 4.2 重组质粒的连接、转化及筛选原理	38
实验 4.3 电穿孔仪基因转移	44
第五章 DNA 扩增和 cDNA 文库的构建	47
实验 5.1 PCR 扩增目的 DNA	47
实验 5.2 cDNA 文库的构建	52
第六章 分子杂交	61
实验 6.1 Southern 杂交	63
实验 6.2 Northern 杂交	66
实验 6.3 菌落原位杂交	67
实验 6.4 斑点杂交	70
第七章 蛋白质印迹分析	72
实验 7.1 蛋白质印迹分析	72
第二部分 应用基因工程技术	79
第八章 微生物分子生态研究	79

实验 8.1 环境微生物总 DNA 的提取.....	80
实验 8.2 DGGE 分析微生物的多样性	82
实验 8.3 实时荧光定量 PCR	87
第九章 分子鉴定	93
实验 9.1 荧光原位杂交实验	99
实验 9.2 16S rDNA 序列分析及 Blast 和系统树软件	101
第十章 荧光蛋白基因标记技术.....	103
实验 10.1 含荧光蛋白基因质粒 DNA 的分离.....	103
实验 10.2 含荧光蛋白基因质粒 DNA 限制性酶切图谱分析.....	104
实验 10.3 感受态细胞制备与含荧光蛋白基因质粒 DNA 转化.....	106
第十一章 赤霉素基因工程菌构建及其发酵和分离.....	109
实验 11.1 赤霉素基因工程菌构建	110
实验 11.2 赤霉素基因工程菌的发酵	111
实验 11.3 赤霉素分离及检测	112
附录	114
附录 1 常用试剂的母液配方	114
附录 2 常用的抗生素	116
附录 3 玻璃和塑料器皿的硅化	117
附录 4 菌种与 DNA 的保存	118
附录 5 器皿的清洗处理	120
附录 6 氨基酸与遗传密码子	123
附录 7 核酸、蛋白质换算数据	124
附录 8 基因工程技术相关试剂和仪器销售公司列举	124
参考文献	126

第一部分 基因工程基本技术

第一章 基因组的提取与检测

基因组是指细胞内遗传信息的携带者 DNA 的总体。基因组中不同的区域具有不同的功能，有些是编码蛋白质的结构基因，有些是复制及转录的调控信号，有些区域的功能尚不清楚。不同的生物体，其基因组的大小和复杂程度各不相同。从原核生物到真核生物，细胞中 DNA 分子的大小随进化程度的提高，其基因组越趋复杂。人类对病毒、细菌及真核细胞染色体基因组结构和功能到人类基因组的认识越来越深入，在此基础上可以实现对生物体基因组的改造和修饰，为人类的生产和生活提供各种形式的服务。这些研究的基础就是首先要能获得生物体的基因组 DNA。本章主要讲述了病毒、细菌和动植物基因组的提取和检测实验。

【实验目的】

通过本实验的学习，了解不同试验材料（包括植物、动物、微生物和病毒）全基因组分离提取的原理、方法和注意事项等；掌握冷冻高速离心机、微量移液枪等分子生物学常用仪器设备的使用。

【实验原理】

生物的大部分 DNA 都集中在细胞核或者核区中。真核生物的 DNA 主要存在于细胞核中，与蛋白质结合构成大小不一的染色体。原核生物的 DNA 不与任何蛋白质相结合。

1. 分离纯化核酸的总原则

①保持基因组相对完整：根据不同研究需要，保证结构的相应完整性；②纯度高：尽量排除其他大分子成分的污染（蛋白质、多糖及 RNA 等），保证提取样品中不含对酶有抑制作用的有机溶剂及高浓度的金属离子；③得率好：选用合适的方法获得足够量的 DNA 进行后续的分析。

2. 核酸纯化的要求

①核酸样品中不应存在对酶有抑制作用的有机溶剂和过高浓度的金属离子；②其他生物大分子的污染应降低到最低程度；③排除其他核酸分子的污染。

3. 基因组 DNA 提取的步骤

基因组 DNA 的提取过程主要包括以下五个步骤。

(1) 准备适宜的材料 材料的选择是第一步，最好使用新鲜的材料，如新鲜的植物、刚制备好的菌液等。低温保存的样品材料注意不要反复冻融；组培细胞培养时间不能过长，否则会造成 DNA 降解；含病毒的液体材料 DNA 含量较少，提取前先富集。材料的用量应适度，过少造成核酸提取量少，过多会影响裂解过程，导致 DNA 量少，纯度低。

(2) 温和的裂解细胞或包膜——内容物释放 裂解细胞的方法有很多，包括物理法、化学法和生物法等，例如，冻结-融化法（冻融法）、机械研磨法、超声波破碎法、去垢剂

法、酶解法等。针对不同材料,选择适当的裂解预处理方式,例如,植物材料——液氮研磨,动物组织——匀浆或液氮研磨,组培细胞——蛋白酶 K,细菌——溶菌酶破壁,酵母——破壁酶或玻璃珠。

(3) 核酸分离纯化,去除蛋白质和多糖 分离的基本原理是采用酚-氯仿(1:1)等蛋白质变性剂进行抽提。蛋白质变性,经离心沉降后,去除蛋白质,同时促使核糖体释放核酸(核酸溶于缓冲液,即水相);利用基因组 DNA 较大的特性,可将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 及各类 RNA 分离。

(4) 沉淀并吸附核酸,去除 RNA 加入等体积异丙醇或 2 倍体积冰无水乙醇,沉淀基因组,即肉眼可见形成纤维状絮团,即可用玻棒将其挑出,小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部;最后用缓冲液透析除去去垢剂和有机溶剂,从而达到分离提取基因组 DNA 的目的。

(5) 核酸溶解 核酸溶解于适量的缓冲液或水中。

4. 核酸制备注意事项

- ① 尽量简化操作步骤,缩短提取过程;
- ② 减少化学因素对核酸的降解;
- ③ 减少物理因素对核酸的降解,如机械剪切力和高温;
- ④ 防止核酸的生物降解。

5. 其他

在经典方法中,从样品溶液中去掉蛋白质采用酚-氯仿(1:1)进行抽提,其标准程序是酚抽提一次,酚-氯仿(1:1)抽提一次,氯仿抽提一次。有时还需重复几次。实验中应该注意酚具有高度腐蚀性,易引起严重的烧伤,故在涉及酚的所有实验操作中,实验者须采取一定的防护措施;实验使用的酚为商品酚,重蒸且用 Tris 缓冲液饱和(pH 8.0)后才能使用。酚极易被氧化,产生其氧化物如醌、二酸等,可破坏核酸的二酯键,并引起 DNA 链的交联,因此饱和后还需要加入 8-羟基喹啉等以减少酚氧化,并提供颜色指示,如果黄色消失或呈粉红色,则不能使用。

在提取过程中,染色体 DNA 会在机械剪切力的作用下断裂,产生大小不同的片段,故分离时的操作应尽量温和。例如,尽量减少酚-氯仿抽提,混匀过程要轻缓,以保证得到较长的 DNA。一般来说,构建基因组文库所需的初始 DNA 长度必须在 100kb 以上,否则酶切后两边都带合适末端的有效片段很少。而进行 RFLP 和 PCR 分析时, DNA 长度可短至 50kb,在该长度以上,可保证酶切后产生 RFLP 片段(20kb 以下),并可保证包含 PCR 所扩增的片段(一般 2kb 以下)。

近年来,流行采用 CTAB 法提取基因组 DNA,这种方法是 1980 年由 Murray 和 Thompson 修改而成的快速简便方法。十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)为一种阳离子去污剂,可溶解细胞膜,能与核酸形成复合物,在高盐溶液(>0.7mol/L NaCl)中是可溶的,当盐浓度降低到一定程度(0.3mol/L NaCl)时,可沉淀 CTAB-核酸的复合物,通过有机溶剂抽提和离心沉降即可去除蛋白质、多糖和酚类等杂质。最后通过冰乙醇或异丙醇沉淀 DNA,而 CTAB 因可溶于冰乙醇或异丙醇而被除去。操作时需要注意,CTAB 溶液在低于 15℃ 时会形成沉淀析出,因此在将其加入冰冷的生物材料之前必须预热,且离心时温度不要低于 15℃。操作过程中,各成分均有其

关键的作用：Tris-HCl (pH8.0) 提供一个缓冲环境，防止核酸被破坏；EDTA 螯合 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} ，抑制 DNase 活性；NaCl 提供一个高盐环境，使核蛋白 (DNP) 充分溶解，存在于液相中；CTAB 溶解细胞膜，并结合核酸，使核酸便于分离； β -巯基乙醇是抗氧化剂，有效地防止酚氧化成醌，避免褐变，使酚容易去除；PVP (聚乙烯吡咯烷酮) 是酚的络合物，能与多酚形成一种不溶的络合物，有效去除多酚，减少 DNA 中酚的污染，同时它也能和多糖结合，有效去除多糖。

不同生物 (植物、动物、微生物) 的基因组 DNA 的提取方法有所不同，不同种类或同一种类的不同组织因其细胞结构及所含成分的不同，分离方法也各异。在提取某种特殊组织的基因组 DNA 时必须参照文献和个人经验选择相应的提取方法，以获取质量量多的基因组 DNA 大分子。

提取基因组 DNA (染色体 DNA) 通常用于构建基因组文库、Southern 杂交 (包括 RFLP)、PCR 扩增的模板及基因探测等，其质量的好坏直接影响着后面的实验。尤其是组织中的多糖和酶类物质对随后的酶切、PCR 反应等有较强的抑制作用，因此用富含这类物质的材料提取基因组 DNA 时，应考虑除去多糖和酶类物质。

本章实验以水稻幼苗 (禾本科)、动物肌肉组织、大肠杆菌培养物和 λ 噬菌体为材料，学习基因组 DNA 提取和检测的一般方法。

实验 1.1 植物基因组 DNA 的提取

【材料、仪器和试剂】

材料：水稻幼苗或其他禾本科植物。

仪器：移液器、高速冷冻离心机、台式高速离心机、水浴锅、旋涡混合器、陶瓷研钵、50mL 离心管 (有盖) 及 5mL 和 1.5mL Eppendorf (EP) 管，弯成钩状的小玻棒。

试剂：

1. 提取缓冲液 I

100mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 20mmol/L EDTA, 500mmol/L NaCl, 1.5% SDS (十二烷基硫酸钠, sodium dodecyl sulfate)。

2. 氯仿-戊醇-乙醇 (80 : 4 : 16, 体积比)

200mL 氯仿 (A. R., 分析纯), 10mL 戊醇 (A. R.), 40mL 乙醇 (A. R.), 混匀。

3. TE 缓冲液 (pH8.0)

10mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 1mmol/L EDTA (pH8.0), 121°C 高压蒸汽灭菌, 4°C 贮存。

4. 10mg/mL RNase A

10mg RNase A, 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5), 15mmol/L NaCl, 100°C 保温 15min, 室温下缓慢冷却, -20°C 贮存 (配制时需要戴手套)。

5. 70% 冰乙醇

95% 乙醇 70mL, dH₂O 25mL, -20°C 贮存。

6. 5×TBE 缓冲液

54g Tris, 27.5g 硼酸, 20mL 0.5mol/L EDTA (pH8.0), 加 dH₂O 定容至 1000mL。

7. 10×上样缓冲液 (pH7.0)

50mmol/L EDTA, 60%甘油, 0.25% 二甲苯氰 FF (w/v), 0.25%溴酚蓝 (w/v)。

8. Goldviewna I 或 Goldviewna II

Goldviewna 是一种可代替溴化乙锭 (EB) 的新型核酸电泳染色剂, 无毒性, 其灵敏度与 EB 相当 (50ng 级), 使用方法与之完全相同。在波长 230nm 和 490nm 左右的紫外灯下双链 DNA 呈现绿色荧光, 而单链 DNA 呈现红色荧光。使用时可在微波炉中加热后直接加往胶中, 最好使用新鲜的电泳缓冲液, 电泳完毕在 -20℃ 冰箱中放置 2~3min 后再观察, 效果更佳。

9. 2×CTAB (十六烷基三甲基溴化铵, cetyltrimethyl ammonium bromide) 溶液 (表 1-1)

2% CTAB (w/v), 100mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 20mmol/L EDTA (pH8.0), 1.4mol/L NaCl, 0.1% PVP (聚乙烯吡咯烷酮)。

表 1-1 CTAB 提取缓冲液配制

试剂 ^① 名称	相对分子质量	配制 1000mL	配制 500mL
Tris	121.14	12.114g	6.057g
EDTA-Na ₂	372.24	7.4448g	3.7224g
NaCl	58.44	81.816g	40.908g

① 用 HCl 调节 pH。

10. 氯仿-异戊醇 (24:1, 体积比)

240mL 氯仿 (A. R.), 10mL 异戊醇 (A. R.), 混匀。

11. 3mol/L 乙酸钠 (NaAc, pH6.8)

81.62g NaAc · 3H₂O, dH₂O 溶解, 配制成 200mL, 用 HAc 调 pH 至 6.5。

12. 其他试剂

液氮、异丙醇、无水乙醇、β-巯基乙醇、DNA Marker。

【实验步骤】

1. SDS 法提取植物基因组 DNA

① 取 20mL 提取缓冲液 I 加入到 50mL 离心管中, 60℃ 水浴预热。

② 水稻幼苗或叶子 5~10g (一般 5g 样品基本可保证获得 500μg DNA, 足够供 RFLP、PCR 等分析之用), dH₂O 冲洗干净、滤纸吸干、剪碎, 大小为 2~6mm (越短越好)。

③ 将剪碎的水稻幼苗或叶子全部移入经液氮预冷的瓷研钵 (必须是瓷研钵, 玻璃研钵低温易碎), 加少量液氮磨成粉状 (需戴线手套, 防止冻伤手, 研磨越细越好), 中途不断添加液氮以保持样品不解冻, 迅速用灭菌的不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中, 剧烈摇动混匀, 60℃ 水浴保温 30~60min (时间长, 利于提高 DNA 产量), 不时摇动。

④ 加入 20mL 氯仿-戊醇-乙醇 (80:4:16) 溶液, 颠倒混匀 (需戴手套, 防止损伤皮肤), 室温下静置 5~10min, 使水相和有机相分层, 有机相一般由无色→绿色→墨绿色 (必要时可重新混匀、静置)。

⑤ 室温下 5000r/min, 离心 5min。

⑥ 小心移取上清液至另一支 50mL 离心管 (若上清液仍为绿色, 应重复步骤④和⑤, 直至上清液变为透明色), 加入 1 倍体积异丙醇, 颠倒混匀, 室温下放置片刻即出现絮状 DNA 沉淀。

⑦ 在 1.5mL EP 管中加入 1mL TE 溶液, 备用。

⑧ 用钩状玻璃棒挑出 DNA 絮团，干净吸水纸吸干，转入含 TE 的 EP 管中，DNA 很快溶解于 TE 溶液中。

⑨ 如步骤⑥中 DNA 不形成絮状沉淀，可用 5000r/min 离心 5min，去上清，再将沉淀移入 TE 溶液中。这样收集的 DNA 沉淀，往往难溶解，可在 60℃ 水浴放置 15min 以上，帮助溶解。

⑩ 将 DNA 溶液 3000r/min 离心 5min，上清液倒入干净的 5mL 离心管中。

⑪ 加入 5 μ L RNase A (10mg/mL)，37℃ 保温 20min，除去 RNA (RNA 对 DNA 的操作、分析一般无影响，可省略该步骤)。

⑫ 加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc 及 2 \times 体积的冰乙醇 (无水乙醇提前放于 -20℃ 冰箱中预冷)，颠倒混匀，-20℃ 放置 30min 以上 (时间长可增加得率)，DNA 形成絮状沉淀。

⑬ 用钩状玻璃棒挑出 DNA 沉淀，用 70% 冰乙醇漂洗，再用干净吸水纸吸干乙醇。

⑭ 将 DNA 溶解于 1mL TE 中，-20℃ 贮存。

⑮ 取 2~5 μ L DNA 样品在 0.7% 琼脂糖胶上电泳，检测 DNA 的分子大小。同时取 15 μ L 稀释 20 倍，测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀，检测 DNA 含量及质量。

⑯ 进一步可进行电泳鉴定，结果如图 1-1。

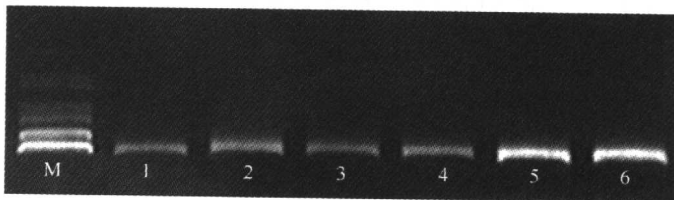


图 1-1 植物基因组 DNA 电泳图谱 (引自 BIOER)

M—分子量标准；1,2—植物块茎提取物；3,4—大豆粉提取物；5,6—植物叶提取物

2. CTAB 法提取植物基因组 DNA

① 取 1.5mL EP 管，加入 250 μ L 的 2 \times CTAB，65℃ 预热 (CTAB 需要在 65℃ 保温溶解，充分混匀后使用)，用前加入 10 μ L β -巯基乙醇。

② 幼嫩的植物组织 500mg，洗净、吸干、剪碎 (冻存材料必须直接研磨，绝对不能化冻；研磨后的粉末应在化冻前转移，否则内源性 DNase 有可能降解基因组 DNA)。

③ 移入经液氮预冷的研钵中，加入液氮研磨至粉末状，用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中，总体积达到 500 μ L，混匀后置 65℃ 水浴中保温 45~60min，并不时轻轻转动试管。

④ 加入等体积的氯仿-异戊醇 (24:1)，轻轻地颠倒混匀，室温下 10 000r/min 离心 10min，移上清至另一支新 EP 管中。

⑤ 加入 0.8~1 倍体积异丙醇或 2 倍体积冰无水乙醇 (沉淀 DNA)，颠倒混匀，出现絮状沉淀，-20℃ 放置 30min 或 -80℃ 放置 10min。

⑥ 室温下 12 000r/min 离心 10~15min，回收 DNA 沉淀。

⑦ 弃上清，用 70% 冰乙醇清洗沉淀两次。

⑧ 抽真空将乙醇去除，溶于 100 μ L TE 缓冲液中。

⑨ 取 2~5 μ L DNA 样品在 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的完整性。同时取

15 μ L 稀释 20 倍, 测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀, 检测 DNA 含量及质量。

【注意事项】

1. 简化操作步骤, 缩短提取过程, 避免物理、化学和生物的因素对核酸的降解, 例如机械剪切力、高温和 DNase 等酶。加入去垢剂、蛋白变性剂、DNase 抑制剂及少量金属离子螯合剂, 如 0.01mol/L EDTA 或柠檬酸钠, 基本可以全部失活。

2. 最好使用新鲜、幼嫩的材料, 低温保存的材料不要反复冻融, 材料应适量, 过多会影响裂解, 导致 DNA 量少, 纯度低。

3. 如果 DNA 沉淀呈白色透明状而且溶解后成黏稠状, 说明 DNA 含有较多的多糖类物质, 可在取材前将植物放暗处 24h, 达到去除淀粉的目的。

4. 如果 DNA 沉淀呈棕色, 难以用限制性内切酶完全消化。植物材料含有大量酚类化合物, 与 DNA 共价结合, 使 DNA 呈棕色, 并抑制 DNA 的酶解反应。为防止此情况出现, 可在加入 2 \times CTAB 的同时加入 2%~5% 的巯基乙醇, 或者加入亚精胺 (100 μ L DNA 加 5 μ L 0.1mol/L 的亚精胺)。

5. 采用有机抽提 (酚-氯仿抽提) 时应充分混匀, 但动作要轻柔, 离心分离两相时, 应保证一定的转速和时间。

6. 当沉淀时间有限时, 可用预冷的乙醇或异丙醇, 沉淀会更充分, 或者沉淀时加入 1/10 体积的 3mol/L NaAc (pH5.2), 有利于沉淀完全。

7. 沉淀用 70% 冰乙醇清洗两次或更多次, 以除去盐离子等, 待乙醇充分挥发后, 重新溶于 TE 溶液中。

8. 在提取 DNA 的各个操作过程中要避免剧烈振荡, 提取液及用品要高温高压灭菌; 另外, 使用吸头吸取过程中应避免产生气泡, 吸头应剪去尖部。

实验 1.2 动物基因组 DNA 的提取

【材料、仪器和试剂】

材料: 新鲜鼠肝、牛肝等哺乳动物新鲜组织。

仪器: 移液器、高速冷冻离心机、台式高速离心机、水浴锅、旋涡混合器、50mL 离心管 (有盖) 及 5mL 和 1.5mLEP 管。

试剂:

1. 分离缓冲液

10mmol/L Tris-HCl (pH7.4), 10mmol/L NaCl, 25mmol/L EDTA。

2. 10% SDS

在 900mL dH₂O 中溶解 100g 电泳级 SDS, 加热至 68 $^{\circ}$ C 助溶, 加入几滴浓盐酸调节溶液的 pH 至 7.2, 加 dH₂O 定容至 1L, 分装备用。

3. 20mg/mL 蛋白酶 K (proteinase K)

将 200mg 的蛋白酶 K 加入到 9.5mL dH₂O 中, 轻轻摇动, 直至蛋白酶 K 完全溶解。不要涡旋混合。加 dH₂O 定容到 10mL, 然后分装成小份贮存于 -20 $^{\circ}$ C。

4. 酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1, 体积比)

将 Tris-HCl 平衡苯酚与等体积的氯仿-异戊醇 (24:1) 混合均匀后, 移入棕色玻璃

瓶中置于 4℃ 保存。

5. 10mg/mL RNase A

配制方法见实验 1.1 试剂 4。

6. 5mol/L NaCl

称取 29.2g NaCl, 溶解于足量的 dH₂O 中, 定容至 100mL。

7. 其他试剂

液氮、乙醚、无水乙醇、70%冰乙醇、3mol/L NaAc、TE、生理盐水。

【实验步骤】

- ① 取 10mL 分离缓冲液加入到 50mL 离心管中, 备用。
- ② 切取新鲜牛肝 5g 左右, 剔除结缔组织, 用预冷的生理盐水清洗 3 次, 吸水纸吸干, 剪碎, 越细小越好。
- ③ 将剪碎的组织全部移入经液氮预冷的瓷研钵, 加少量液氮磨成粉状, 中途不断添加液氮以保持样品不解冻, 迅速用灭菌的不锈钢勺转移粉末到离心管中, 剧烈摇动混匀。
- ④ 加 1mL 10% SDS, 颠倒混匀, 此时样品变得很黏稠。
- ⑤ 加 50 μ L 或 1mg 蛋白酶 K, 混匀, 37℃ 保温 1~2h, 直到组织完全解体。
- ⑥ 加 1mL 5 mol/L NaCl, 混匀, 5000r/min 离心数秒钟。
- ⑦ 取上清液于新 EP 管, 用等体积酚-氯仿-异戊醇 (25 : 24 : 1) 抽提, 颠倒混匀室温下静置 5~10min, 使水相和有机相分层。
- ⑧ 3000r/min 离心 5min。
- ⑨ 取上层水相移至干净 EP 管中, 加 2 倍体积乙醚抽提 (在通风情况下操作)。
- ⑩ 移去上层乙醚, 保留下层水相。
- ⑪ 加 1/10 体积 3mol/L NaAc, 2 倍体积冰无水乙醇颠倒混合沉淀 DNA。室温下静置 10~20min, DNA 沉淀形成白色絮状物。
- ⑫ 用玻棒挑出 DNA 沉淀, 70%冰乙醇中漂洗后, 在吸水纸上吸干, 溶解于 1mL TE 中, -20℃ 保存。
- ⑬ 如果 DNA 溶液中有不溶解颗粒, 可在 5000r/min 短暂离心, 取上清; 如要除去其中的 RNA, 可加 5 μ L RNase A (10 μ g/ μ L), 37℃ 保温 30min, 用酚抽提后, 按步骤⑨、⑩重沉淀 DNA。
- ⑭ 进一步可进行电泳鉴定, 结果如图 1-2。

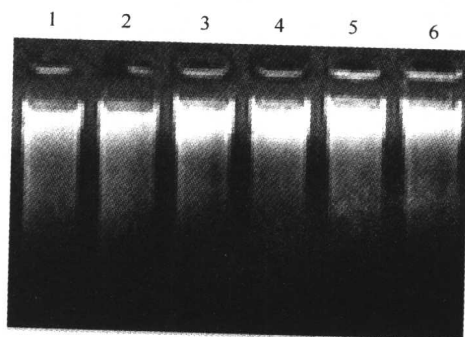


图 1-2 动物基因组 DNA 电泳图谱 (引自 AXYGEN)

1,2—小鼠心脏; 3,4—小鼠肝组织; 5,6—小鼠肾组织

实验 1.3 细菌基因组 DNA 的制备

【材料、仪器和试剂】

材料：DBT 降解菌或其他细菌培养物。

仪器：移液器、速冷冻离心机、台式高速离心机、水浴锅、旋涡混合器、50mL 离心管（有盖）及 5mL 和 1.5mL EP 管。

试剂：

1. LB (Luria-Bertani) 液体培养基

胰化蛋白胨（细菌培养用）10g，酵母提取物（细菌培养用）5g，NaCl 10g，加 ddH₂O 至 1000mL，完全溶解，分装小瓶，0.1MPa (151bf/in²) 高压灭菌 20min。

2. 裂解液

40mmol/L Tris-乙酸，20mmol/L 乙酸钠，1mmol/L EDTA，1% SDS，pH8.0。

3. 1% SDS

在 90mL dH₂O 中溶解 1g 电泳级 SDS，用 dH₂O 定容至 100mL。

4. Tris-HCl 饱和苯酚

5. 其他试剂

5mol/L NaCl、氯仿、无水乙醇、70%冰乙醇、TE。

【实验步骤】

① 细菌接种于 5mL LB 液体培养基中，37℃，200r/min，振荡培养过夜。

② 取 1.5mL 培养物于 1.5mL EP 管中，12 000r/min 室温离心 30s，弃上清，倒置 EP 管于吸水纸上吸干。

③ 加入 400 μ L 裂解液，用移液枪反复吹吸辅助裂解，置于 37℃ 水浴 30min。

④ 加入 132 μ L 的 5mol/L NaCl 溶液，颠倒试管，充分混匀，13 000r/min 离心 15min。

⑤ 用粗口枪头（用消毒后的剪刀剪去 1mL 枪头的尖端）小心取出上清液转入新的 EP 管中。

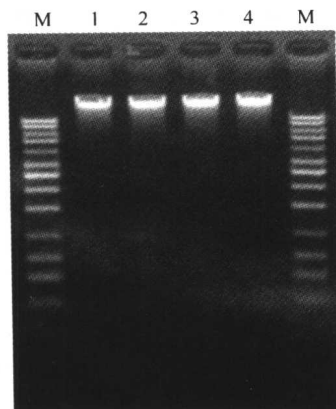


图 1-3 细菌基因组 DNA 电泳图谱
M—1kb DNA 梯度；1~4—*E. coli*
JM-109 DNA (0.3 μ g DNA/泳道)

⑥ 加入等体积的饱和苯酚，颠倒混匀，12 000r/min 离心 3min，离心后的水相如果浑浊则说明仍含有蛋白质，则需将上清液转入新的 EP 管，重复上述步骤直到水相透明，水相和有机相之间不再白色沉淀物为止（约 2 次）。

⑦ 将上层清液转入新的 EP 管，加等体积的氯仿，颠倒混匀，13 000r/min 离心 3min，以便除去苯酚。

⑧ 小心吸出上清液转入新的 EP 管，用预冷的 2 倍体积的无水乙醇沉淀，放置 -20℃ 冰箱 30min。

⑨ 13 000r/min 离心 15min，可见白色丝状沉淀物。

⑩ 小心吸出上清液，弃去，用 400 μ L 预冷 70% 乙醇洗涤 2 次。

⑪ 室温干燥后，用 50 μ L TE（含 20 μ g/mL 的 RNase）溶解 DNA，-20℃ 冰箱放置备用。

⑫ 进一步可进行电泳鉴定, 结果如图 1-3。

【注意事项】

1. 步骤⑤中吸取上清需用已经剪口的枪头吸取, 减小机械剪切力对基因组 DNA 的损伤。
2. 加入苯酚时需要戴手套, 苯酚具有腐蚀性, 小心操作。
3. 苯酚-氯仿抽提时, 注意 PEG、蛋白质等杂质污染, 它们会影响限制性内切酶切割。
4. 无水乙醇可以事先放入 -20°C 中预冷, 待使用时再取出。

实验 1.4 病毒基因组 DNA 的提取

病毒基因组 DNA 提取的基本原则——先从感染组织或细胞, 以及含病毒排泄物和分泌物中提取病毒粒子, 然后去除病毒蛋白, 提取病毒核酸。在提取过程中, 要注意避免核酸酶对病毒核酸的降解作用。此外在提取较大分子量的病毒 DNA 时 (如痘病毒 DNA), 要彻底去除病毒蛋白 (通常使用蛋白酶 K) 和避免剧烈振荡 (否则核酸链断裂)。

λ 噬菌体是最早使用的克隆载体, λ 噬菌体的基因组是一长度约为 50 kb 的双链 DNA 分子, 它在宿主细胞有两种生活途径。其一是裂解生长, 环状 DNA 分子在细胞内多次复制, 合成大量噬菌体基因产物, 装配成噬菌体颗粒, 裂解宿主菌再进行下一次感染; 其二是溶源性生长, 即感染细胞内 λ 噬菌体 DNA, 整合到宿主菌染色体 DNA 中与之一起复制, 并遗传给子代细胞, 宿主细胞不裂解。平板培养时, 裂解生长的宿主形成噬菌斑; 液体培养时, 裂解生长使菌液中宿主菌最后全部裂解而释放出大量的噬菌体颗粒。经过改造的 λ 噬菌体克隆位点可插入一定长度的外源 DNA。许多 cDNA 和基因组文库是以 λ 噬菌体作为克隆载体构建的。因此, 在经文库筛选得到目的克隆后, 常常需要利用 λ 噬菌体裂解生长的特点, 培养获得大量的噬菌体颗粒, 并提取 λ 噬菌体 DNA 来开展进一步的工作。

【材料、仪器和试剂】

材料: *E. coli*, λ 噬菌体。

仪器: 生化培养箱、灭菌锅、超净工作台、试管、Eppendorf 管 (EP 管)、涡旋混合器、低温高速离心机、微量移液器、真空干燥器、恒温水浴锅、微型台式真空泵、恒温摇床和冰箱。

试剂:

1. LB 液体培养基

配制方法同实验 1.3 试剂 1。

2. 1.5% 琼脂 LB 固体培养基

LB 液体培养基 100mL/250mL 锥形瓶, 琼脂粉 1.5g, 0.1MPa (151bf/in²) 高压灭菌 20min, 稍冷却, 制备平板。

3. 0.7% 琼脂 LB 固体培养基

LB 液体培养基 100mL/250mL 锥形瓶, 琼脂粉 0.7g, 0.1MPa (151bf/in²) 高压灭菌 20min, 稍冷却, 制备平板。

4. 20%麦芽糖

麦芽糖 20g, 加 ddH₂O 至 100mL, 0.22 μ m 滤膜过滤。

5. SM 液

NaCl 5.8g, MgSO₄ · 7H₂O 2g, 1mol/L Tris-HCl (pH7.5) 50mL, 2%明胶 5mL, 加 ddH₂O 至 1000mL。0.1MPa (151bf/in²) 高压灭菌 20min。

6. 10mg/mL RNase A

配制方法见实验 1.1 试剂 4。

7. 10mg/mL DNase I

TE 配制, 分装后贮存于 -20℃。

8. 苯酚-氯仿-异戊醇 (25:24:1, 体积比)

9. 氯仿-异戊醇 (24:1, 体积比)

10. 其他试剂

异丙醇、无水乙醇、70%乙醇、PEG 8000 10% SDS、0.5mol/L EDTA (pH8.0)。

【实验步骤】

1. λ 噬菌体的培养

(1) λ 噬菌体平板培养

① 将 1.5%琼脂 LB 固体培养基融化, 在超净工作台中倒平板, 每皿约 15mL 培养基, 轻轻晃动平板使均匀分布, 室温放置 2~4d, 凝固后备用。

② 用 SM 液将 λ 噬菌体原种稀释为 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷ 等浓度梯度。

③ 取 0.1mL 各梯度稀释液分别置 5mL EP 管中离心, 加 0.2mL 新鲜培养的宿主菌 *E. coli*, 加麦芽糖 (0.2%), MgSO₄ (10mmol/L), 37℃ 温育 20min, 使噬菌体颗粒吸附于细菌。

④ 取融化 (47℃) 的 0.7%琼脂 LB 固体培养基 3mL 与上述各管混匀, 立即倒入步骤①备好的平板内, 轻轻晃动平板使均匀分布。

⑤ 37℃ 培养 6~8h 后, 观察噬斑形成。

⑥ 用剪去部分头部的吸头挖取单个噬斑到 0.5mL 的 SM 液中, 加 0.05mL 氯仿, 振荡。在 37℃ 温育 10min。

⑦ 重复步骤①~⑤, 获得单个噬斑滴度。

(2) λ 噬菌体液体培养

① 取 2mL 新鲜培养的宿主菌, 离心, 0.4mL LB 培养基重悬, 加 λ 噬菌体 0.1mL [新鲜获得的单个噬斑, 依滴度使之与宿主菌比约 1:(500~1000)]。

② 加麦芽糖 (0.2%)、MgSO₄ (10mmol/L), 37℃ 温育 20min, 使噬菌体颗粒吸附于细菌。

③ 加到 100mL LB 液体培养基中, 加麦芽糖 (0.2%)、MgSO₄ (10mmol/L), 37℃ 振荡培养 9~12h 后, 可见裂解发生。

④ 加 0.1mL 氯仿, 37℃ 继续振荡培养 10~20min。

2. λ 噬菌体 DNA 提取

① 将上述裂解液转移至干净的 EP 管, 10 000r/min 离心 10min, 去细菌碎片, 取上